

**INFEKTION DER WEISSEN RATTE MIT
HUMANEM - UND MÄUSE - CYTOMEGALIE - VIRUS
UNTER EINER IMMUNSUPPRESSIVEN THERAPIE**

ANDREAS MIETASCHK
—

1973
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

**INFEKTION DER WEISSEN RATTE MIT HUMANEM- UND MÄUSE-CYTO-
MEGALIE-VIRUS UNTER EINER IMMUNSUPPRESSIVEN THERAPIE**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Mietaschk

aus

Fürstenfeldbruck

1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Otmar Goetz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Erich Langer

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1973



I n h a l t s a n g a b e

	Seite
A. Einleitung	1
I. Immunsuppressive Medikamente und deren Angriffspunkte	3
II. Unterdrückung der Immunantwort durch Corticosteroide oder Cyclophosphamid	4
III. Änderung der Virusempfänglichkeit durch Corticosteroide oder Cyclophosphamid	5
B. Experimenteller Teil	7
I. Material und Methodik	7
1. bei Immunsuppression durch Corticosteroide	7
2. bei Immunsuppression durch Cyclophosphamid	10
II. Ergebnisse eigener Untersuchungen	15
1. Verhalten des Körpergewichtes während der Behand- lung mit Corticosteroiden und Chloramphenicol	15
2. Verlauf der Virusinfektion bei Immunsuppression durch Corticosteroide	17
3. Besondere Beobachtungen aufgrund der immun- suppressiven Therapie mit Cyclophosphamid	19
4. Verlauf der Virusinfektion bei Immunsuppres- sion durch Cyclophosphamid	21
a) Verlauf bei jugendlichen Ratten	21
b) Verlauf bei Saugratten	21
c) Isolierungsversuche aus Organen infizierter Tiere	23
d) Bakteriologische Ergebnisse	23
e) Histologische Ergebnisse	26
III. Diskussion der Ergebnisse	30
C. Zusammenfassung	35
D. Literatur	36

Herrn Prof. Dr. med. Otmar Goetz möchte ich besonders für die Überlassung des interessanten Themas danken sowie für seine fachliche Beratung während meiner Arbeit im Viruslabor.

Mein Dank gilt auch Fräulein Heidemarie Kupfer, die mich mit technischen Grundlagen der Virologie als Voraussetzung für diese Arbeit vertraut machte.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Friedrich-Baur-Stiftung durchgeführt.

A. Einleitung

Das Cytomegalie-Virus ist ein mittelgroßes, membranbegrenztes Virus, das weltweit anzutreffen ist. Als DNA-Virus gehört es wie das Varizellen-Virus und das Epstein-Barr-Virus zur Herpes-Subgruppe B.

Eine Infektion mit dem humanen Cytomegalie-Virus (HCMV) verläuft meist inapparent und persistiert lange Zeit. 80 % aller Erwachsenen haben komplementbindende und neutralisierende Antikörper. Bei Neugeborenen kann es dagegen durch diaplacentare Infektion des Feten zu einer oft tödlichen Generalisation kommen.

Man unterscheidet drei Verlaufsformen:

1. Die hepatische Verlaufsform mit Hepatosplenomegalie, Ikterus und petechialen Blutungen.
2. Eine cerebrale Verlaufsform mit Neigung zu Hirnblutungen, Krämpfen, Mikrocephalie oder Hydrocephalus internus so wie intracranielle Verkalkungen.
3. Eine seltene pulmonale Verlaufsform, die an eine interstitielle plasmazelluläre Pneumonie erinnert.

Die Diagnose gelingt auf cytologischem Weg durch Nachweis typischer Riesenzellen (Eulenaugenzellen) mit intranucleären und cytoplasmatischen Einschlusskörperchen in Organen mit besonderer Virusaffinität, wie Speicheldrüsen, Leber, Niere und Gehirn, ebenso im Speichel und Urin. Auch ein serologischer Nachweis virusneutralisierender Antikörper so wie eine Isolierung aus infiziertem Material ist möglich.

Die Erstbeschreibung des Cytomegalie-Virus erfolgte 1881 durch RIBBERT, die Namensgebung geht auf TALBOT (1921) zurück. Die Virusanzüchtung gelang erst 1956 SMITH und Mitarbeitern.

Drei antigendifferente Stämme des Cytomegalie-Virus (CMV) sind bisher bekannt. Eine Antigenverwandtschaft mit den tierischen CMV, von denen es eine große Anzahl gibt, kann bisher nicht gefunden werden.

Eine Züchtung der Viren ist nur auf homologen Fibroblasten-Kulturen möglich, wobei sich ein cytopathogener Effekt ausbildet. Es ist bekannt, daß das CMV sehr artspezifisch ist. Eine Übertragung von einer Spezies auf eine andere war trotz vieler Versuche bisher immer wieder erfolglos geblieben.

Schon 1934 versuchte KUTTNER und WANG (27) das humane Cytomegalie-Virus auf junge Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse und den Rhesusaffen zu übertragen. Sie verwandten dazu eine Aufschwemmung aus Speicheldrüsenmaterial verstorbener Neugeborener, in dem sich histologisch die typischen intranucleären Einschlusskörperchen vorgefunden hatten. Trotz verschiedener Injektionsarten (intracerebral und intraglandulär) so wie Röntgenvorbestrahlung, mißglückte der Versuch. Auch das Hamster-CMV in gleicher Weise auf Kaninchen und Meerschweinchen zu adaptieren, brachte keinen Erfolg.

Mit diesen Resultaten stimmten auch Beobachtungen von SCHMIDT-RUPPIN (46) überein.

Im Jahre 1935 schlug bei gleicher Versuchsanordnung von KUTTNER und T'UNG. (26) die Übertragung des Ratten-CMV auf Mensch, Hamster und Maus fehl.

Weitere negative Versuche, das Virus auf eine andere Spezies anzupassen, wurden von SMITH (51) und MEDEARIS (32) publiziert.

DIOSI, BABUSCEAC und LAVID (8) infizierten Albino-Mäuse, Meerschweinchen und in vitro embryonale Mäuse-Fibroblasten-Kulturen mit einem CMV-Stamm des einfärbigen Ziesels (*Citellus citellus*), eines hamsterähnlichen Tieres, das besonders in Osteuropa beheimatet ist. Aber auch in diesem Fall konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Eine Ausnahme stellte nur ein, von der afrikanischen Meerkatze (*Cercopithecus*) isolierter Virusstamm dar, der, wie BLACK, HARTLEY, und ROWE (2) berichteten, auch auf menschlichen Zellen kultiviert werden konnte.

Schon KUTNER und TUNG (26) hatten versucht, eine mögliche virusübertragung durch immunsuppressive Vorbehandlung mit Röntgenstrahlen und einem sog. Duran-Reynals-Faktor (Hodenextrakt einer homologen Tierart) zu erreichen. Durch die modernen Möglichkeiten einer medikamentösen Immunsuppression scheinen diese versuche wieder aktuell geworden zu sein.

I. Immunsuppressive Medikamente und deren Angriffspunkte

Zu der Gruppe der Immunsuppressiva (58) gehören die Antimetabolite (Folsäure- und Purinantagonisten), die durch Hemmung der RNA- und DNA-Synthese die Proliferation der Immunoblasten und damit die Antikörper (AK)-Produktion verhindern. an dem gleichen Ort der Immunabwehr greifen auch die alkylierenden Substanzen Cyclophosphamid, Chlorambucil und mephalan ein, außerdem Antibiotika wie das Actinomycin und etwas schwächer wirksam, nach BERENBAUM (1) das Puromycin und Chloramphenicol.

Zusätzlich verhindern alle diese Pharmaka noch die Transformation der kleinen Lymphozyten in große Immunoblasten.

Eine Wirkung des Cyclophosphamids auf die phagozytische Aktivität des reticuloendothelialen Systems (RES) im Tierexperiment wird von ZSCHIESCHE und AUGSTEN (59) sowie von MANY und SCHWARTZ (30) nicht gefunden, während andere Autoren (50, 29) eine Beeinträchtigung des RES und der Phagozytosefähigkeit annehmen.

Zu den immunsuppressiven Medikamenten werden auch die Corticosteroide wie Prednisolon u. ä. gezählt. Sie wirken schon hemmend auf den Antigentransport und beeinträchtigen die Phagozytenfunktion (1). Außerdem schädigen sie nach WILMANNS (58) das lymphatische System durch eine direkte Zytolyse der Lymphozyten und verhindern durch Eingriff in den DNA-Stoffwechsel ebenfalls die Proliferation der Immunoblasten und auf diese Weise die AK-Bildung. Die unmittelbar dämpfende Wirkung der Corticosteroide bei den Immunreaktionen vom

Sofort- und vom verzögerten Typ und bei den Reaktionen des Organismus, wie Anaphylaxie und Begleitentzündung, sind lange bekannt.

Eine besondere und umfassende Wirkung hat das Antilymphozytenserum (4, 36). Es zerstört die antikörpertragenden Lymphozyten sowohl in der Blutbahn wie auch am Wirkungsort. Außerdem hemmt es die Komplement- und Entzündungsreaktion. Auf diesen Tatsachen beruht die rasch einsetzende Wirkung des Antilymphozytenserum z. B. bei Abstoßungskrisen nach Organtransplantationen.

II. Unterdrückung der Immunantwort durch Corticosteroide und Cyclophosphamid

Von den aufgeführten immunsuppressiven Medikamentengruppen scheinen die alkylierenden Substanzen (wie das Cyclophosphamid) und die Corticosteroide durch ihre verschiedenen Eingriffe in die Immunabwehr des Organismus zu einer guten Unterdrückung immunologischer Reaktionen befähigt zu sein. Dies konnte auch durch zahlreiche Arbeiten belegt werden.

KASS (21) berichtete, daß hohe Cortisondosen im Tierexperiment eine hemmende Wirkung auf die AK-Bildung ausüben. Dieser Einfluß der Corticosteroide wurde von BLUMER (3) sowie von WARD und JOHNSON (56) nur bei der primären AK-Bildung beobachtet, während die Reinjektion von Antigenen nach stattgefundener AK-Bildung eine normale Boosterung hervorrief. Bereits gebildete AK sanken unter einer Cortisonbehandlung etwas ab.

DUKOR und DIETRICH (9, 10) fanden den immunsuppressiven Effekt von Corticosteroiden am stärksten bei Gabe vor dem Antigen, während durch Cyclophosphamid eine maximale Suppression noch bei Applikation 1 - 3 Tage nach dem Antigen erreicht wurde. Außerdem war unter der Cyclophosphamid-Therapie mit steigender Antigendosis eine zunehmende Verhinderung der AK-Produktion festzustellen. Cortisonacetat hatte in diesem Fall eine entgegengesetzte Wirkung.

Andere Autoren (13, 14, 45, 49) sahen bei ähnlicher Versuchsanordnung und bei einer Dosis von 75 mg/kg - 115 mg/kg Cyclophosphamid über mehrere Tage verteilt, die primäre zelluläre Immunantwort gänzlich unterdrückt.

Zahlreiche Arbeiten befaßten sich mit der Hemmung der Entstehung von AK gegen abgetötete *Brucella abortus* bzw. *melitensis* bei Ratten durch Cyclophosphamid (FINGER (12); KRÖGER (25); POTEL (37, 38, 39); SCHNEIDER (47); STENDER u. a. (52);).

Annähernd 10 Tage konnte die Ausbildung in fast allen Fällen vollständig verhindert werden. Beide Therapieformen, fraktionierte Gabe und Stoßtherapie von 8 - 120 mg/kg, führten zu einer dosisabhängigen Verminderung der AK-Bildung.

KAZÁR u. a. (22) zeigten, daß sich artfremde Rickettsienstämme durch Cyclophosphamid an Mäuse adaptieren ließen und aus den Organen wieder isoliert werden konnten, was bei den Kontrolltieren nicht möglich war.

Eine ebenfalls starke bakterielle Vermehrung fanden TRIPATHY und MACKANESS (55) bei der Maus nach einer *Listeria*-Infektion. Auch hier fiel die lange immunsuppressive Wirkung einer Cyclophosphamid-Dosis von 100 mg/kg auf.

III. Änderung der Virusempfänglichkeit durch Corticosteroide und Cyclophosphamid

Es ist bekannt, daß unter immunsuppressiver Behandlung nicht nur die Abwehr bakterieller, sondern auch virusbedingter Infektionen behindert ist.

COLE und NATHANSON (6) infizierten Mäuse intracerebral mit dem Dengue-Virus. Während die Kontrollen nur mit einer leichten Encephalitis reagierten, an der kein Tier starb, überlebte keines, der mit Cyclophosphamid vorbehandelten Tiere den Versuch. Bei intracerebraler Inoculation von West Nile-Virus bei Ratten kam es ebenfalls zu einer erhöhten Mortalität und zu einer vollständigen Unterdrückung neutralisierender AK bei der Cyclophosphamid-Gruppe.

Mit diesen Untersuchungen stimmten auch Ergebnisse von LAYER (31), ROBINSON u. a. (43), THIND und PRICE (53) sowie LÜBKE (28) überein.

MIYOSHI und Mitarbeiter (35) konnten unter Vorbehandlung mit

150 mg/kg Cyclophosphamid einen neurotrophen Stamm eines Influenza A-Virus auf junge Affen übertragen, was bisher noch nicht gelungen war.

Bei Virus-Erkrankungen ist immer wieder vor der Anwendung von Corticosteroiden gewarnt worden, da die Infektionen einen besonders schweren Verlauf nehmen können. Auch im Tierversuch konnte die virusbegünstigende Wirkung des Cortisons gezeigt werden (7, 23, 46).

Bei Mäusen, die mit Mäuse-CMV infiziert waren, rief Cortison eine generalisierte Erkrankung hervor. Zusätzlich war die Virussynthese in der Leber gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Zwischen dem 5. und 7. Tag fanden sich in den typischen Organen, wie Leber, Milz und Niere, nucleäre Einschlusskörper (19).

Besondere Aufmerksamkeit verdienen Arbeiten von RAYNAUD und Mitarbeitern (40, 41). Ihnen gelang es, ein von der Feldmaus stammendes CMV auf die mit Cortison vorbehandelte Hausmaus zu adaptieren, was ohne Immunsuppression bisher noch nicht gelungen war. Außerdem war es möglich diesen neuen Virusstamm auf heterologe Zellen zu kultivieren und ihn auf zwei Tierarten (Hamster und Maus) zu übertragen, wobei er die charakteristischen Zellschäden des CMV hervorrief.

Im Hinblick auf die gute immunsuppressive Wirkung der Corticosteroide und des Cyclophosphamids und deren Fähigkeit, die Virusempfänglichkeit zu ändern, scheint eine Infektion der Ratte mit artfremden Cytomegalie-Viren unter immunsuppressiver Therapie von Interesse zu sein.

B. Experimenteller Teil

I. Material und Methodik

1. bei Immunsuppression durch Corticosteroide

Versuchstiere:

Verwandt wurden Wistarratten beiderlei Geschlechts, mit Gewichten zwischen 70 und 100 g, die zu jeweils 3 - 5 Tieren in Käfigen gehalten wurden. Die Ernährung erfolgte durch Preßfutter und Wasser mittels Trinkflasche ad libitum.

Medikamente:

a) Prednisolon (Dehydro-hydrocortison)-21-hemisuccinat-Natrium (Solu-Decortin-H, Merck, Darmstadt) 50 mg - 250 mg wurde in Aqua bidest. so gelöst, daß Konzentrationen von 1,25 mg/0,1 ml bis 12,5 mg/0,1 ml entstanden.

b) Mit Chloramphenicol (Leukomycin-Testsubstanz 100 mg, Bayer, Leverkusen) und Aqua bidest. wurden Lösungen hergestellt, von denen 1 ml 2,5 mg Substanz enthielt.

Virus:

Humanes Cytomegalie-Virus, Stamm AD 169, (Hygiene-Institut, Freiburg) Titer 10^4 wurde benutzt, sowie Mäuse-Cytomegalie-Virus (SMITH MSGV, Nat. Inst. of Health, Dr. Wallace, P. Rowe, Rockville, Maryland) Titer: $4,65 \times 10^6$ PFU/ml, Röhrchen: 10^6 .

Die Virulenz wurde durch Röhrchen-Titration festgestellt. Als Titer wurde die höchste Verdünnung angegeben, die bei den beimpften Gewebekulturen noch einen eindeutigen cytopathogenen Effekt auslöste.

Medium:

Als Grundsatz wurde Eagle's Basal Medium (11) der Grand Island Biological Company genommen, mit Zusatz von je 100 I.E./ml Penicillin, Streptomycin, Gentamycin und Amphotericin B. Nach Verwendungszweck wurden als Wachstumsmedien 10 % Kälberserum und 1 % Natriumbicarbonat-Lösung (5,6 %ig) hinzugefügt, während beim Erhaltungsmedium für die Virusvermehrung der Serumzusatz auf 2 % reduziert wurde. In diesem Fall betrug der Natriumbicarbonat-Zusatz 3 %.

Zellkulturen:

Hierzu dienten embryonale Menschen- und Mäuse-Fibroblasten-Kulturen, die durch Subpassagen auf Röhrchen kultiviert wurden (16). Zu diesem Zweck wurde aus einer Kulturflasche, in der sich der Zellrasen ausgebildet hatte, das Medium entfernt. Nach kurzzeitigem Zusatz einer geringen Menge (8 - 10 ml) 0,25 %iger Trypsin-Lösung (Difco 1:250), wurde diese verworfen und die Flasche bei 37° C 5 - 10 Minuten inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden dann die Zeichen der Zellablösung abgewartet. Nach Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium erhielt man durch wiederholtes Mischen eine Suspension von Einzelzellen. Von dieser Zellsuspension wurden je 2 ml (ca. 200 000 Zellen) auf ein Röhrchen gegeben und bei 37° C inkubiert. Nach 4 - 5 Tagen konnten die Kulturen für Materialverimpfungen verwendet werden.

Versuchsordnung:

Die Versuchstiere (n = 22), mit einem mittleren Gewicht von 95 g bei Versuchsbeginn, wurden in 3 Kollektive geteilt:

a) Eine Gruppe (n = 13) wurde über eine Dauer von 12 Wochen mit steigenden Dosen Hydrocortison und Chloramphenicol behandelt. Die Dosierung für Cortison bei intramuskulärer Verabreichung lag pro Tag und Ratte bei:

1,25 mg 1. und 2. Woche

2,50 mg 3. und 4. Woche.

Ab 5. Woche wurde die Dosis wöchentlich um 5 mg erhöht. Die Höchstmenge von 25 mg war in der 9. Woche erreicht worden. Die gleichzeitige Chloramphenicol-Gabe (intraperitoneal) von 1,25 mg pro Tag und Ratte in der 1. und 2., sowie 2,5 mg ab der 3. Woche wurde hauptsächlich als Infektionsschutz durchgeführt. Die Injektionen erfolgten täglich zur selben Zeit. Hierbei wurde auch jedesmal das Gewicht der Tiere kontrolliert.

Von den 13 Versuchstieren, die nach dem oben beschriebenen Schema immunsuppressiv vorbehandelt waren, wurden in der 10. Woche 8 Ratten mit humanem Cytomegalie-Virus (Stamm AD 169, Titer 10^4) und 5 Ratten mit Mäuse-Cytomegalie-Virus (Stamm SMITH, Titer $4,65 \times 10^6$ PFU/ml) infiziert. (0,5 - 1 ml i.p. oder 0,5 ml i.p. + 0,2 ml i.m.) Als Trägersubstanz wurde Eagle's Basalmedium verwandt.

b) Zum selben Zeitpunkt wurde auch die Infektion der Virus-Kontrolltiere (n = 3) durchgeführt.

c) Eine weitere Kontrollgruppe (n = 6) wurde nur mit Prednisolon und Chloramphenicol in gleicher Dosierung behandelt.

Nach verschieden langer Latenz (6 - 50 Tage) wurden die Tiere der Virus-Cortison-Gruppe, sofern sie nicht spontan verstorben waren, durch Äthernarkose getötet. Durch einen aseptischen Eingriff erfolgte die Entnahme von Speicheldrüsen, Leber, Milz und Niere.

Das Gewicht der Organe wurde exakt ermittelt und nach

Zufügen der vierfachen Menge an Medium im Tenbroeck (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey) eine Organ suspension hergestellt.

Von den Suspensionen wurden Verdünnungen von 10^{-1} - 10^{-2} hergestellt. Jeweils entsprechende Fibroblastenröhrchen wurden mit 0,2 ml dieser Lösungen beimpft und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Danach abgießen des Überstandes, "füttern" der Röhrchen mit 2 ml Erhaltungsmedium und Aufbewahrung in geeigneter Lage im Brutschrank bei 37° C. Jeden 2. Tag erfolgte mikroskopische Kontrolle der Kulturen auf cytopathogene Effekte. Sobald Umschlag des Indikators ein Sauerwerden des Milieus anzeigte, wurde das Nährmedium erneuert.

Nach einer Beobachtungszeit von 3 - 4 Wochen wurden Subpassagen angelegt, diese weitere 3 Wochen beobachtet und dann vernichtet.

2. bei Immunsuppression durch Cyclophosphamid

Versuchstiere:

Für diese Versuche wurden neben 50 - 120 g schweren jugendlichen Ratten (Ernährung und Unterbringung siehe 1.), hauptsächlich Saugratten mit Gewichten von 10 - 20 g verwandt. Es handelte sich ausschließlich um Wistarratten, von denen die Saugratten jeweils als Wurf (7 - 13 Stück) zusammen mit dem Muttertier in einzelnen Käfigen gehalten wurden.

Depressorsubstanz:

Cyclophosphamid (Endoxan, Asta-Werk, Brackwede) ist N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N'O-propylen-phosphorsäure-esterdiamid. Jeweils 100 mg dieser Substanz wurden in 20 ml Aqua bidest. gelöst. Für einen Teil der Versuche wurde die Lösung mit Aqua bidest. im Volumenverhältnis 1:1 weiter verdünnt, so daß 1 ml

der Flüssigkeit 2,5 mg Cyclophosphamid enthielt. Die Lösungen wurden stets frisch hergestellt und innerhalb eines Zeitraumes von 60 Minuten nach dem Auflösen in einer Dosis von 50 mg/kg oder 25 mg/kg intraperitoneal oder subcutan injiziert.

Virus:

Humanes Cytomegalie-Virus, Stamm Stuttgart (Med. Landesuntersuchungsamt, Virusabt., G. Enders) Titer 10^3 - 10^4 und Stamm USA (Nat. Inst. of Health, Rockvill, Maryland), Titer 10^4 wurden benutzt, sowie Mäuse-Cytomegalie-Virus, Stamm SMITH MSGV, Titer 10^4 . Als Trägersubstanz diente auch in diesem Fall Eagle's Basalmedium, von dem nach leichtem Abzentrifugieren der zellfreie Überstand zur Infektion verwendet wurde. Die Titerbestimmung erfolgte nach der gleichen Methode wie unter 1. beschrieben.

Zellkulturen:

Neben Menschen- und Mäuse-Fibroblasten-Kulturen kamen auch embryonale Fatten-Kulturen zur Verwendung. Hierzu wurden einer frühträchtigen Ratte unter aseptischen Bedingungen Embryonen entnommen und diese mittels geeigneter Instrumente zerkleinert. Dem so gewonnenen Organmaterial wurde die 10-fache Volumensmenge von 0,25 %iger Trypsinlösung (Difco 1:250) für ca. 15 Min. zugesetzt. Nach kurzem Abzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes, wurde das Sediment mit ca. 40 ml Wachstumsmedium (siehe unter 1.) suspendiert und in eine Kulturflasche gebracht, die dann im Brutschrank bei 37° C inkubiert wurde. Nach Ausbildung eines Zellrasens (3 - 5 Tage) wurde das Wachstumsmedium gegen Erhaltungsmedium ausgetauscht und die Flasche, wie unter 1. angegeben, für eine Subpassage auf Röhrchen bereitgestellt.

Versuchsanordnung:

Die Versuchstiere (n = 260) wurden in verschiedene Kollektive geteilt, in denen besonders die Sterblichkeit in den einzelnen Gruppen beobachtet wurde, auch im Hinblick auf verschiedene Infektionsarten (i.p. und i.c.), Alter der Tiere und verwendete Virusart (HCMV oder MCMV).

a) Von den Cyclophosphamid-Kontrolltieren (n = 77) wurden jugendliche Ratten am Tage -2 und 0 mit 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.) und Saugratten am Tage -2 und 0 mit 50 mg/kg bzw. 25 mg/kg subcutan (s.c.) injiziert.

b) Die Cytomegalie-Virus-Cyclophosphamid-Tiere (n = 159) wurden bei gleicher Vorbehandlung zusätzlich am Tage 0 mit einer Virussuspension (HCMV oder MCMV) infiziert.

Intraperitoneal: Jugendliche Ratten mit 1 ml,
Saugratten mit 0,2 ml
oder:

Intracerebral : Jugendliche und Saugratten mit
je 0,002 ml während Äthernarkose.

c) Eine weitere Kontrollgruppe (n = 24) wurde in gleicher Weise nur mit entsprechender Virussuspension inokuliert.

Anhand von 52 Cyclophosphamid-Saugratten (a) und 53 infizierten Saugratten aus der HCMV-Cyclophosphamid-Gruppe (b) wurde unter täglicher Kontrolle das Verhalten der Mortalität in den beiden Kollektiven untersucht. Zur Infektion wurde ausschließlich humanes Cytomegalie-Virus, Stamm Stuttgart, mit einem Titer von 10^3 - 10^4 verwandt. Die Inokulation erfolgte stets intraperitoneal.

Um möglichst identische Ausgangsbedingungen für die beiden Kollektive (a. u. b) zu schaffen, wurde einer größeren Anzahl der Cyclophosphamid-Kontrolltiere

am Tage 0 jeweils 0,2 ml Basalmedium i.p. appliziert. Es stellte sich aber heraus, daß dieser Vorgang keinen registrierbaren Einfluß auf die gewonnenen Ergebnisse hervorrufen konnte.

Spontan verstorbene Ratten waren im allgemeinen für Virusisolierungsversuche verloren, da sie meist vom Muttertier aufgefressen wurden oder eine beginnende Fäulnis eine Organverimpfung zwecklos machte. Letzteres galt auch für jugendliche Ratten.

Aus diesem Grund wurde eine grobe Anzahl von Tieren ($n = 73$), der Gruppe b) an den Tagen 2 -8, 22 und 26 nach Infektion mit HCMV (Stamm USA, Titer 10^4) oder MCMV (Stamm SMITH, Titer 10^4) getötet.

Organentnahme, Verimpfung auf Zellkulturen, Subpassagen und Beobachtungszeit erfolgten wie unter 1. beschrieben. Bei den i.c. infizierten Tieren wurde zusätzlich noch Gehirnmateriel gewonnen. Neben Mäuse- und Menschen-Fibroblasten kamen auch Ratten-Fibroblasten-Kulturen zur Anwendung.

Teile makroskopisch auffälliger Organe (Leber, Niere) wurden zur histologischen Begutachtung in Formalin aufbewahrt. Aseptisch hergestellte Organsuspensionen (ohne Antibiotikazusatz) verschiedener Tiere wurden zur bakteriologischen Untersuchung weiterverwendet.

Histologie:

Entsprechendes Material wurde zunächst in 10%iger Formalin+Lsg. aufbewahrt. Die Einbettung erfolgte in Methylacrylat (5), modifiziert nach Boellard und Hirsch. Die Färbung der Schnitte wurde mit Hämatoxylin und Eosin (44) durchgeführt.

Bakteriologie:

Verschiedene Organaufschwemmungen aus Speicheldrüsen, Leber und Niere dienten als Untersuchungsmaterial.

Durch fraktioniertes Ausspateln (57) auf festen Nährmedien (Fleischwasser-Pepton-Bouillon + 2 - 4 % Agar-Agar, pH 7,2 - 7,4) und Bebrüten bei 37° C über 24 Stunden, wurde der Nachweis einer bakteriellen Besiedelung der Organe versucht.

Statistik:

Soweit Signifikanz-Berechnungen erforderlich waren, wurde die Signifikanz von Unterschieden zwischen Prozentwerten nach HASELOFF-HOFFMANN (17) ermittelt.

II. Ergebnisse eigener Untersuchungen

1. Verhalten des Körpergewichtes während der Behandlung mit Corticosteroiden und Chloramphenicol

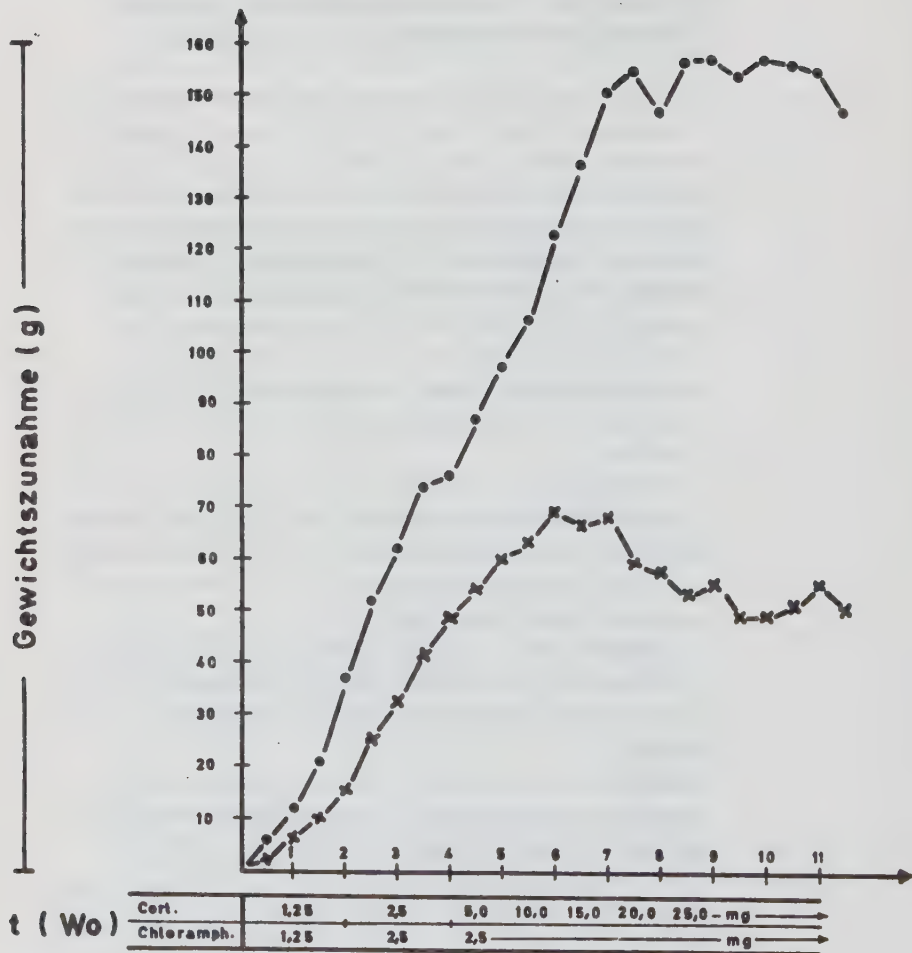
Wie auch aus Tabelle I zu ersehen ist, verhielten sich die Gewichte aller Tiere, die unter immunsuppressiver Therapie standen, etwa gleichartig.

Unter dieser Behandlung konnte bei den Versuchstieren eine relativ gleichmäßig langsam ansteigende Gewichtskurve bis zur 6. und 7. Woche beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt trat dann eine mäßige Gewichtsabnahme ein, die sich bis zum Versuchsende verfolgen ließ. Ihr Maximalgewicht hatten diese Tiere, mit einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 65 - 70 g gegenüber dem Ausgangsgewicht, in der 7. Woche erreicht.

Unbehandelte Tiere hingegen zeigten neben einer steiler verlaufenden Gewichtskurve ab 8. Woche ein Höchstgewicht, das durchschnittlich 155 g über dem Ausgangsgewicht lag und bis zum Ende der Versuche annähernd konstant blieb (siehe Abb. 1).

Das Gewicht der Virus-Kontrollratten stieg dagegen permanent an und erreichte ebenso hohe Endwerte wie es bei völlig unbehandelten Tieren beobachtet werden konnte.

Vom Gewicht her zeigten die Versuchstiere, im Vergleich zu den Kontrollen, übereinstimmend keine Reaktion auf eine Inokulation von HCMV und MCMV.



LEGENDE:

- Kontrollen
- x—x Cort.-u. Chloramph.

Abb.: 1 Mittlere Gewichtskurve von 6 mit Cortison und Chloramphenicol behandelten Ratten, sowie von 5 unbehandelten Kontrolltieren. Durchschnittliches Ausgangsgewicht: 95 g.

2. Verlauf der Virusinfektion bei Immunsuppression durch Corticosteroide

Nachdem in den ersten 10 Wochen die Sterblichkeit unter den Tieren praktisch vernachlässigt werden konnte, stieg diese ab der 11. Woche deutlich an (siehe Tabl. I).

Während die Viruskontrollen nicht auf eine Infektion reagierten, betrug die Spontanmortalität in den immunsuppressiv vorbehandelten Gruppen (Nr. 1 - 13) in den folgenden Wochen annähernd 50 %. Ein ähnliches Ergebnis konnte aber auch bei den Tieren (Nr. 17 - 22) festgestellt werden, denen nur Cortison und Chloramphenicol verabreicht worden war.

Die Tiere der Virus-Cortison-Gruppe (Nr. 1 - 13) wurden, sofern sie nicht spontan verstorben waren, 6 - 50 Tage nach Virusinokulation getötet.

Die Entnahme der virusspezifischen Organe (wie Speicheldrüse, Leber, Milz und Niere), deren Aufbereitung und die Verimpfung auf entsprechende Fibroblastenkulturen erfolgte wie unter I/1 beschrieben. Jeden 2. Tag wurde eine mikroskopische Kontrolle der Kulturen auf cytopathogene Effekte durchgeführt.

Trotz einer Beobachtungszeit von 3 - 4 Wochen und dem späteren Anlegen von Subpassagen, konnten auch während weiterer 3 Wochen keine cytopathogenen Effekte in den Fibroblastenröhrchen gefunden werden. Bei den infizierten Ratten war also ein Cytomegalie-Virus-Nachweis trotz Immunsuppression nicht möglich gewesen.

Tabelle I

Gew. Versuchsbeginn (g)	Immun-suppr.	Gew. bei Virusinf. (g)	Tage nach Virusinf.	"Todes- art"	Gew. Versuchsende (g)	Virusinjektion (ml)
-------------------------	--------------	------------------------	---------------------	--------------	-----------------------	---------------------

Cortison + Chloramphenicol + HCMV-Tiere:

1)	70	C/Ch	89	10	93	0,5ml/i.p.
2)	95	"	165	6	152	1 ml/i.p.
3)	100	"	200	6	195	1 ml/i.p.
4)	108	"	245	6	245	1 ml/i.p.
5)	100	"	149	6	138	1 ml/i.p.
6)	104	"	178	50	161	0,5ml/i.p. +
7)	98	"	154	50	178	0,2ml/i.m. +
8)	98	"	152	34	110	"

Cortison + Chloramphenicol + MCMV-Tiere:

9)	90	C/Ch	155	6	115	0,5ml/i.p.
10)	100	"	172	7	150	0,5ml/i.p. +
11)	104	"	164	7	154	0,2ml/i.m. +
12)	95	"	122	10	92	"
13)	85	"	133	16	119	0,5ml/i.p.

HCMV-Kontrollen:

14)	103	---	254	10	256	0,5ml/i.p. +
15)	100	---	295	10	298	0,2ml/i.m. +

MCMV-Kontrolle:

16)	95	---	210	10	212	0,5ml/i.p. +
-----	----	-----	-----	----	-----	--------------

Cortison + Chloramphenicol-Kontrollen:

17)	998	C/Ch	182	7	145	--
18)	95	"	186	7	175	--
19)	100	"	199	7	175	--
20)	95	"	133	10	124	--
21)	85	"	130	10	121	--
22)	85	"	135	13	133	--

Tabelle I: Vergleich zwischen infizierten Ratten und Kontrolltieren inbezug auf Mortalität und Körpergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten

C/Ch: 1,25 - 25 mg Cortison/d/Ratte i.m.

1,25 - 2,5 mg Chloramphenicol/d/Ratte i.p.

✠ : spontan verstorben

⚡ : getötet

3. Besondere Beobachtungen aufgrund der immunsuppressiven Therapie mit Cyclophosphamid

Unter dieser Behandlung zeigten die Virus-Cyclophosphamid-Tiere eine ebenso langsame Gewichtszunahme, die manchmal von einer deutlichen Gewichtsreduktion abgelöst wurde, wie die Cyclophosphamid-Kontrollen.

Die Körpergewichte der Viruskontrollen verhielten sich dagegen völlig gleichartig gegenüber gesunden, nicht immunsuppressiv behandelten Tieren.

Die unterschiedlichen Gewichtsverläufe waren also nur durch den Einfluss des Cyclophosphamids zustande gekommen (siehe Tabl. II).

5 - 6 Tage nach Therapiebeginn zeigten die Saugratten eine langsam von apikal nach caudal fortschreitende Alopezie. Im Verlauf einiger Wochen setzte der Haarwuchs von apikal beginnend wieder ein, und nach 4 - 6 Wochen war in bezug auf Felddichte kein Unterschied mehr zu unbehandelten Kontrolltieren festzustellen.

Jugendliche Ratten entwickelten unter der immunsuppressiven Therapie mit 2 x 50 mg/kg Cyclophosphamid keine Alopezie.

Tabelle II

Gew. Versuchs- beginn (g) Tag: -2	Immun- suppr.	Tage nach Virusin- fektion:	"Todes- art"	Gew. Ver- suchsende (g)	Virusinjek- tion (ml) Tag: 0
---	------------------	-----------------------------------	-----------------	-------------------------------	------------------------------------

Cyclophosphamid + MCMV-Tiere:

1)	80	Cycloph.	10	♣	72	1 ml/i.p.
2)	95	"	26	♣	92	1 ml/i.p.
3)	75	"	26	♣	92	1 ml/i.p.

Cyclophosphamid + HCMV-Tiere:

4)	126	Cycloph.	22	♣	171	0,002ml/i.o.
5)	103	"	7	♣	85	0,002ml/i.o.
6)	105	"	22	♣	161	0,002ml/i.o.
7)	72	"	22	♣	105	0,002ml/i.p.

MCMV-Kontrollen:

8)	85	---	26	---	162	1 ml/i.p.
9)	125	---	26	---	160	1 ml/i.p.
10)	89	---	26	---	136	1 ml/i.p.

HCMV-Kontrollen:

11)	101	---	22	---	190	0,002ml/i.o.
12)	99	---	22	---	122	0,002ml/i.o.
13)	66	---	22	---	146	0,002ml/i.o.
14)	72	---	22	---	160	0,002ml/i.o.
15)	54	---	22	---	125	0,002ml/i.o.

Cyclophosphamid-Kontrollen:

16)	85	Cycloph.	13	♣	62	---
17)	85	"	26	---	96	---
18)	110	"	26	---	109	---
19)	115	"	13	♣	81	---
20)	58	"	6	♣	51	---
21)	52	"	19	♣	60	---
22)	46	"	22	---	80	---

Tabelle II: Vergleich zwischen infizierten jugendlichen Ratten und Kontrolltieren inbezug auf Mortalität und Körpergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten

Cycloph.: Tag -2 : 50 mg/kg i.p.

Tag 0 : 50 mg/kg i.p.

♣ : spontan verstorben

♣ : getötet

4. Verlauf der Virusinfektion bei Immunsuppression durch Cyclophosphamid

a) Verlauf bei jugendlichen Ratten

Die Sterblichkeit war bei allen jugendlichen Ratten, die unter einer Immunsuppression standen, annähernd gleich hoch (siehe Tabl. II). Eine intraperitoneale oder sogar intracerebrale Virusinjektion, wie sie bei den Tieren Nr. 1 - 7 durchgeführt worden war, hatte keine Änderung der Mortalität zur Folge. Die unbehandelten Tiere Nr. 8 - 15 reagierten nicht auf eine intraperitoneale oder intracerebrale Virusapplikation.

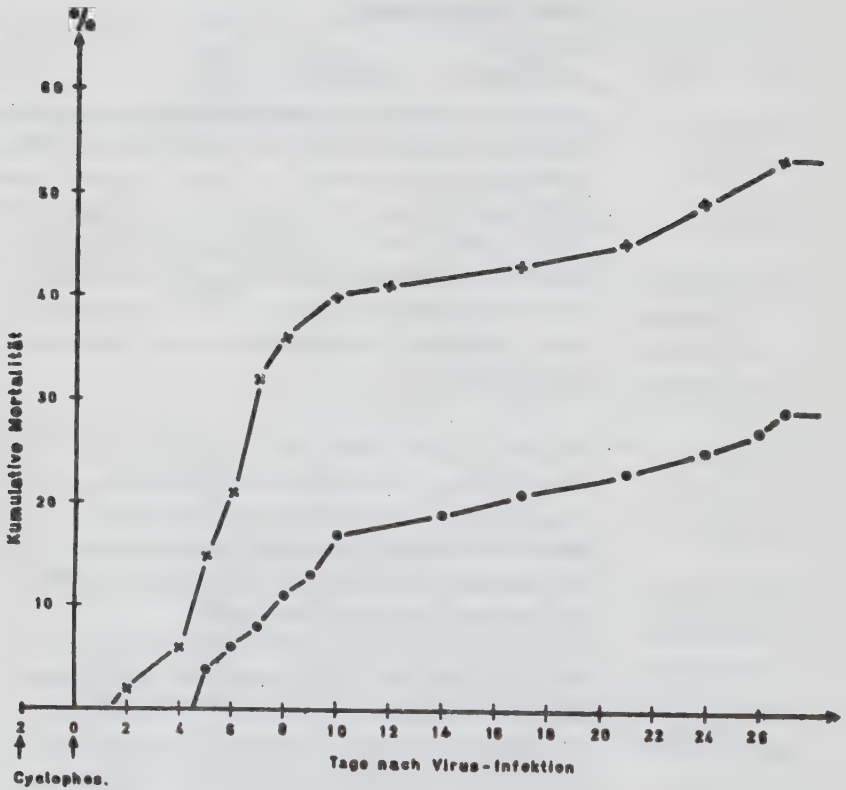
b) Verlauf bei Saugratten

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, verstarben die ersten Tiere der Virus-Cyclophosphamidgruppe schon 2 Tage nach Infektion, während bei den Cyclophosphamid-Kontrollen Todesfälle vor dem 5. Tag nicht zu verzeichnen waren.

Ab 7. Tag zeigte die Mortalität in den beiden Gruppen einen deutlich signifikanten Unterschied. Zu diesem Zeitpunkt betrug sie bei den Virus-Cyclophosphamidratten schon 32 %, während von den nur immunsuppressiv behandelten Tieren nur 8 % verstorben waren. Ab 10. Tag verhielt sich die Sterblichkeit in den beiden Kollektiven etwa gleichartig, so daß am Versuchsende die Gesamt mortalität bei den infizierten Tieren um 24 % höher lag als die der Cyclophosphamid-Kontrollen (vergl. Abb. 2).

Der Allgemeinzustand war besonders in der 1. Versuchswoche bei den Virus-Cyclophosphamidratten deutlich reduziert.

Bei den Viruskontrolltieren konnten keine Reaktionen auf die intraperitoneale Virusapplikation festgestellt werden. Todesfälle waren hier nicht aufgetreten.



LEGENDE:

- Cyclophos.-Kontrollen
- x— HCMV - Cyclophos.

Abb.: 2 Verhalten der Mortalität (kumulativ) bei 52 immunsuppressiv behandelten und bei 53 zusätzlich mit humanem Cytomegalie-Virus infizierten Saugratten

Cyclophos.: Tag -2 : 50 mg/kg
Tag 0 : 25 mg/kg

c) Isolierungsversuche aus Organen infizierter Tiere

Aus Abb. 3 zeigt sich, daß in der täglichen Mortalität der Saugratten aus der Virus-Cyclophosphamid-Gruppe ein Maximum zwischen 4. und 7. Tag nach Infektion erreicht wurde.

73 Tiere aus diesem Kollektiv wurden an den Tagen 2 - 8, 22 und 26 nach Infektion mit HCMV oder MCMV getötet, und entsprechende Organe auf verschiedene Fibroblastenkulturen verimpft.

Nähere Angaben über Infektionsmodus und Verteilung der Tiere sind aus der Tabl. III zu ersehen.

Nach einer Beobachtungszeit von 3 - 4 Wochen wurden von den Kulturen Subpassagen angelegt, und diese weitere 3 Wochen beobachtet. Da in keinem Fall cytopathogene Effekte festzustellen waren, mußten die Versuche, Cytomegalie-Viren in den Organen infizierter Ratten nachzuweisen, als nicht gelungen angesehen werden.

d) Bakteriologische Ergebnisse

Um einen Hinweis auf die Ursache der hohen Mortalität zwischen dem 4. und 7. Tag nach Infektion zu bekommen, wurde bei 18 Saugratten der Virus-Cyclophosphamid-Gruppe der Nachweis einer möglichen bakteriellen Besiedelung verschiedener Organe mit nachfolgender allgemeiner Sepsis versucht. Hierzu wurden die Tiere an den Tagen 2, 4 und 7 nach Virusinokulation getötet (vergl. Tabl. III). Als Untersuchungsmaterial dienten Suspensionen aus den üblichen Organen.

Auf den mit Leber oder Niere beimpften Agarplatten ließ sich in allen Fällen nach Bebrüten kein Wachstum von Bakterien nachweisen. In den Speicheldrüsenaufschwemmungen fanden sich dagegen öfter eine geringe Anzahl grampositiver Keime (z. B. hämolyzierende Staphylokokken), deren Herkunft wahr-

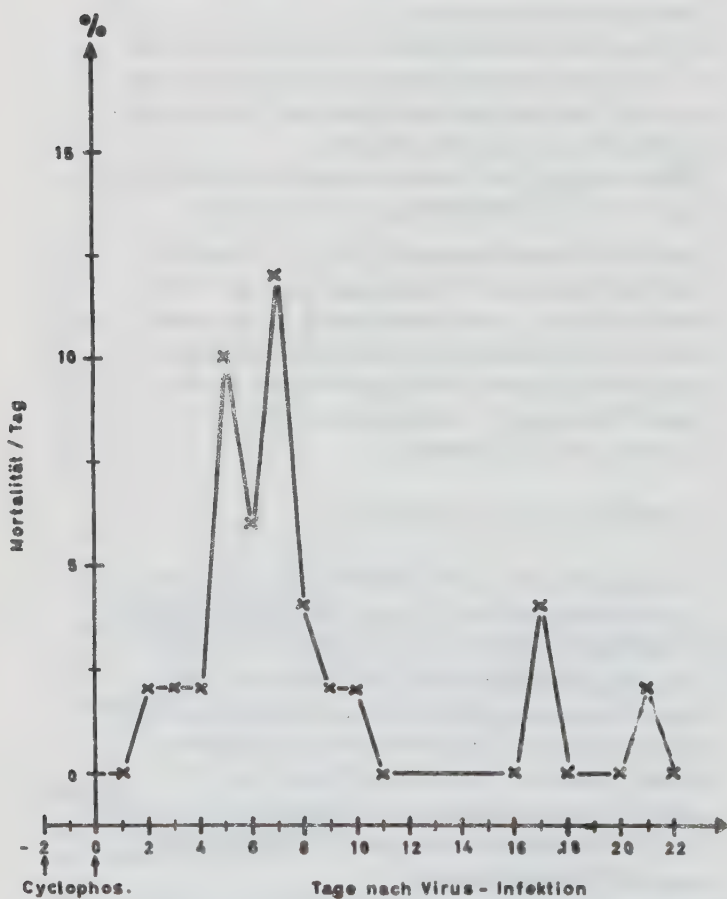


Abb. 3 Tägliche Mortalität von 53 mit Cyclophosphamid behandelten Saugratten nach Infektion mit humanem Cytomegalie-Virus

Tabelle III

Tage nach Virusinf.:	Anzahl der Tiere	Infektionsmodus	Kulturart	Alter der Tiere
2	6	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
3	10	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
4	6	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
5	13	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
6	6	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
7	12	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
7	2	HCMV 0,002ml/i.o.	HF	j.R./Sr.
8	13	HCMV 0,2 ml/i.p.	HF + RF	Sr.
22	3	HCMV 0,002ml/i.o.	HF	j.R.
26	2	MCMV 1,0 ml/i.p.	MF	j.R.

Tabelle III: Versuch der Virusisolierung aus Organen infizierter Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten

HF: humane Fibroblasten-Kulturen

RF: Ratten-Fibroblasten-Kulturen

MF: Mäuse- Fibroblasten-Kulturen

Sr: Saugratten j.R.: jugenliche Ratten

scheinlich in der schwierigen aseptischen Gewinnung und in einer physiologischen Besiedelung der Drüsengänge zu suchen war.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die hohe Sterblichkeit unter den immunsuppressiv behandelten Saugratten aller Wahrscheinlichkeit nach nicht mit einer bakteriellen Infektion erklärt werden.

e) Histologische Ergebnisse

Von den immunsuppressiv behandelten Saugratten, die zusätzlich mit HCMV infiziert worden waren, zeigte die Leber bei der Sektion häufig ein makroskopisch verändertes Bild. Neben einer etwas teigigen Konsistenz fiel hauptsächlich eine blasse rote Farbe mit einzelnen hellgelben Sprenkelungen auf.

Die auffälligen Organe (und jeweils die Nieren) von fünf dieser Tiere wurden histologisch untersucht.

Zur Kontrolle dienten entsprechende Präparate von gesunden Tieren und von Saugratten, die mit der normalen Cyclophosphamiddosis behandelt waren. +

1. Die beiden Kontrollgruppen boten keine wesentlichen Veränderungen in ihren Präparaten. Die Leberschnitte wiesen in beiden Fällen nur eine leichte herdförmige zentrale Hyperämie auf (siehe Abb. 4 und 6).

2. Bei den Virus-Cyclophosphamid-Tieren konnten die typischen lichtmikroskopischen Befunde einer Cytomegalie nicht erhoben werden.

Während die Nierenschnitte keinen Unterschied zu den Kontrollen erkennen ließen, stellten sich aber in den Leberpräparaten deutliche Veränderungen dar (siehe Abb. 5 und 7). Neben einer Hyperämie und Sinusektasie zeigte sich zum Teil ein überwiegend zentrolobulär gelegener feinwa-

biger Aufbau der Hepatozyten, was entweder einer feintröpfigen (z. B. hypoxischen) Verfettung entsprach oder ausschließlich durch eine Vergrößerung subzellulärer Strukturen (z. B. endoplasmatisches Retikulum) hervorgerufen wurde. Am Übergang zu den intakten Hepatozyten fanden sich größere, optisch leer erscheinende Vakuolen, die aller Wahrscheinlichkeit nach die Folge einer Verfettung waren. Außerdem wies eine Wucherung und Schwellung der Kupfferzellen auf eine "Aktivierung" des RES hin.

⁺ Herrn Dr. med. P. Meister, path. Institut der Universität München, danke ich für die Beurteilung der Präparate.

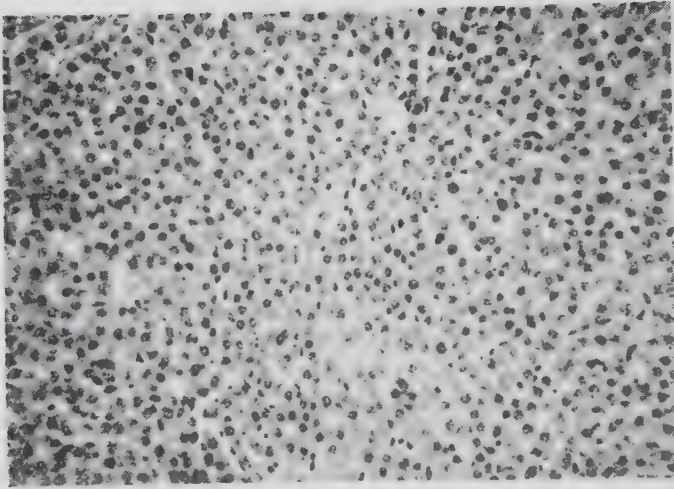


Abb.: 4 Leberpräparat: Saugratte nach Cyclophosphamidbehandlung (Vergr. 100 x)

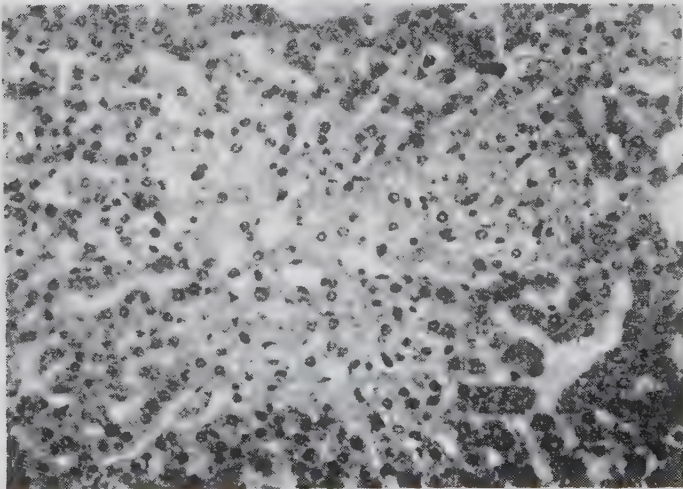


Abb.: 5 Leberpräparat: Saugratte nach Cyclophosphamidbehandlung und Infektion mit HCMV (Vergr. 100 x)

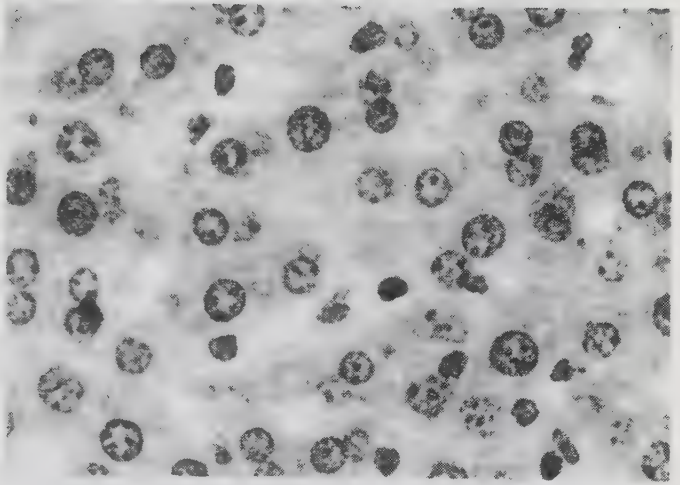


Abb.: 6 Leberpräparat: Saugratte nach Cyclophosphamid-
behandlung (Vergr. 400 x)

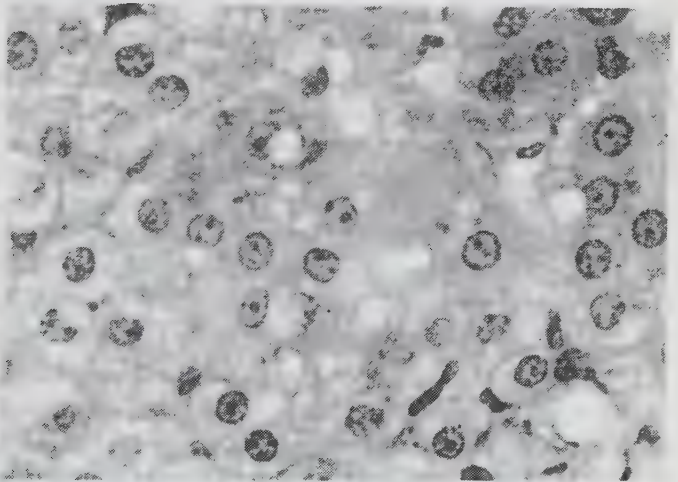


Abb.: 7 Leberpräparat: Saugratte nach Cyclophosphamid-
behandlung und Infektion mit HCMV
(Vergr. 400 x)

III. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde versucht, durch verschiedene immunsuppressiv wirksame Substanzen bei Ratten eine Änderung ihrer Resistenz gegenüber HCMV oder MCMV hervorzurufen.

1. Dabei zeigte sich, daß die Körpergewichte der Tiere unter der Behandlung mit Corticosteroiden und Chloramphenicol weit hinter denen unbehandelter Ratten zurückblieben. Diese Ergebnisse stimmten auch mit Untersuchungen von GOETZ (15) überein. In diesem Fall verhielten sich bei einzelner Verabreichung der Medikamente die Gewichtskurven nicht auffällig gegenüber denen entsprechender Kontrollen. Die langsamere Gewichtszunahme bei kombinierter Anwendung ist möglicherweise auf den verstärkten Eingriff in den RNA- und DNA-Stoffwechsel zurückzuführen und auf die damit verbundene Hemmung der Proteinsynthese (1). Auch eine allgemeine Schwächung der Tiere durch Aktivierung latenter Infektionen muß in Betracht gezogen werden (15).

2. 1965 war es RAYNAUD und Mitarbeitern (40) gelungen, das Cytomegalie-Virus der Waldmaus auf die mit Cortison vorbehandelte Hausmaus zu übertragen.

1969 war es dem gleichen Arbeitskreis möglich, dieses auf die Hausmaus adaptierte Virus auf Hamster-, Affen- und menschlichen Zellen zu züchten (41).

Eine Infektion neugeborener Mäuse und Hamster mit Material aus diesen Viruskulturen bewirkte bei den Tieren die charakteristischen Befunde einer CMV-Erkrankung.

In Anlehnung an diese Versuche wurde von uns bei Ratten entsprechenden Alters unter einer ähnlichen immunsuppressiven Behandlung mit Hydrocortison und Chloramphenicol eine Infektion mit HCMV oder MCMV durchgeführt.

Vergleichbare Resultate konnten jedoch nicht gewonnen werden. Eine Virusvermehrung ließ sich bei keinem der Tiere nachweisen, obwohl mit 25 mg pro Tag und Ratte, und bei Einbeziehung der unterschiedlichen Gewichte, eine mindestens gleichwertige Immundepression hätte erreicht werden müssen. Letzteres kann auch durch Vergleich mit anderen Arbeiten bestätigt werden (7, 19, 46).

Es hat sich also gezeigt, daß eine Resistenz der Ratte gegenüber MCMV und HCMV durch Corticosteroide nicht durchbrochen werden konnte. Als Grund für eine verhinderte Virusvermehrung müssen aber auch eine evt. Interferonbildung der Versuchstiere und das Auftreten eines "serum protective"-Faktors (SPF), wie von THIND (54) beschrieben, in Betracht gezogen werden.

Es bleibt zu überlegen, ob durch eine Verwendung von jüngeren Tieren, die nicht mit Bildung eines SPF reagieren, positivere Ergebnisse hätten erzielt werden können. Andererseits fand DOBRZYŃSKY (7), daß Cortison eine Infektion mit Herpesvirus hominis nur bei jugendlichen Mäusen förderte, während sehr junge Mäuse keine verstärkte Reaktion zeigten.

3. Für einen weiteren Versuch mit ähnlichem Aufbau wurde von uns als immunsuppressive Substanz das Cyclophosphamid gewählt. Durch seine verschiedenen Ansatzpunkte am Immunsystem schien es zur Unterdrückung einer Immunantwort noch besser geeignet zu sein als die Corticosteroide (9, 10).

a) Während der Behandlung mit Cyclophosphamid kam es bei allen Ratten zu einer verzögerten Zunahme oder sogar zu einer Reduktion ihrer Körpergewichte. Dieser Effekt wurde auch von MILLER (34) und SHARBAUGH (50) beschrieben, und ist von der Dosis abhängig.

b) Die bei den Saugratten 5 - 6 Tage nach Therapiebeginn aufgetretene Alopezie ist ebenfalls auf das Immunsuppressivum zurückzuführen (20, 34).

c) Nach Infektion mit CMV zeigte sich bei den immunsuppressiv behandelten jugendlichen Ratten keine Wirkung, während bei den Saugratten eine deutlich erhöhte Mortalität gegenüber Kontrollen zu verzeichnen war.

Der Versuch, eine Virusvermehrung durch Verimpfung verschiedener Organe auf Zellkulturen nachzuweisen, war in allen Fällen erfolglos geblieben. Auch die Annahme, eine Adaptation des Virus auf die Ratte erfordere zur Reisolierung embryonale Rattenkulturen, brachte keine positiven Ergebnisse.

Die Cyclophosphamiddosis von 100 mg/kg bzw. 75 mg/kg mußte zu einer weitgehenden und mindestens 10 Tage anhaltenden Immunsuppression geführt haben (12, 25, 37, 38, 39, 47, 52).

Ein möglicher latenter Infektionsverlauf bei den Virus-Cyclophosphamid-Saugratten, der eine erhöhte Mortalität zur Folge hatte, muß in Betracht gezogen werden.

Die fehlende Reaktion der jugendlichen Ratten auf die CMV-Infektion kann dagegen evt. auf das Auftreten des SPF zurückgeführt werden, der ähnlich dem Interferon und dem neutralisierenden Antikörpern eine Virusvermehrung verhindert, und auch trotz Cyclophosphamidbehandlung zu beobachten ist (54).

Eine Interferonbildung ist in unserem Fall infolge der Immunsuppression mit Cyclophosphamid weitgehend auszuschließen (42).

Auch an die Möglichkeit eines uncharakteristischen toxischen Effekts des CMV bei den Saugratten muß gedacht werden. Neuere Untersuchungen von KIM und Mitarbeiter (24) könnten in dieser Richtung gedeutet werden.

d) POTEL (37) konnte erst bei hohen Dosen Cyclophosphamid (120 mg/kg) latente Infektionen, zum Teil mit Todesfolge, nachweisen. Dadurch werden auch die negativen bakteriologischen Ergebnisse in unserem Fall begründet.

e) Um weitere Aufschlüsse über die Ursachen der größeren Sterblichkeit der Saugratte in der Virus-Cyclophosphamidgruppe zu bekommen, wurden noch zusätzlich histologische Untersuchungen durchgeführt.

Die hepatozellulären Veränderungen von einigen dieser Tiere und die normalen Befunde bei den Kontrollen sind nur schwer zu erklären.

Bei HEGEWALD (18) traten Leberschäden erst nach einer 12 Wochen dauernden Verabreichung von 6 mg/kg Cyclophosphamid auf.

Nach LÜBKE (28) waren Leberveränderungen nicht so sehr von der Zahl und Höhe der Cyclophosphamiddosen abhängig, sondern beruhten auf einer unterschiedlichen Empfindlichkeit einzelner Kollektive.

Analog dem CPE in den Zellkulturen besitzt das CMV zyto- und histotoxische Eigenschaften gegenüber zahlreichen Geweben, vor allem dem Hirngewebe, der Leber und dem hämatopoetischen System (SEIFERT, 48).

SCHMIDT-RUPPIN (46) fand nach Infektion mit MCMV in der Leber Zeichen einer Hepatitis und Nekrosen im Leberparenchym. Einschlusskörper waren regelmäßig vorhanden.

RAYNAUD (41) beschrieb Leberschäden, die bei jungen Hamstern nach Impfung mit dem, von der Waldmaus adaptierten CMV auftraten. Bei der Autopsie war eine Leber mit weißlichen Flecken, wie in unserem Fall, festzustellen. Im histologischen Präparat waren Einschlusskörper manchmal, jedoch nicht immer vorhanden!

Die histologischen Leberveränderungen bei den Saugratten könnten also auch mit einer latenten CMV-Infektion im Zusammenhang stehen bzw. durch eine zytotoxische Wirkung des CMV erklärt werden.

Der Versuch, durch eine veränderte Technik bei der Organverimpfung, durch Verwendung von empfindlicheren Kultursystemen (33) oder mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode ein mögliches Vorhandensein von CMV in den infizierten Tieren nachzuweisen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

C. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der weißen Ratte der Einfluß einer immunsuppressiven Therapie auf eine Infektion mit humanem-Cytomegalie-Virus (HCMV) oder Mäuse-Cytomegalie-Virus (MCMV) untersucht.

Annähernd 280 Ratten (jugendliche- oder Saugratten) wurden zu diesem Zweck in verschiedene Kollektive geteilt. Als Depressorsubstanzen kamen neben Corticosteroiden (kombiniert mit Chloramphenicol) in weiteren Untersuchungen das Zytostatikum Cyclophosphamid zur Anwendung.

In den einzelnen Gruppen wurden besonders das Verhalten der Körpergewichte, die Mortalität und der Allgemeinzustand der Tiere registriert.

Es konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden:

Unter Immunsuppression mit Corticosteroiden bzw. Cyclophosphamid reagierten die jugendlichen Ratten in keiner Weise auf eine Infektion mit HCMV oder MCMV. Die aufgetretene Spontanmortalität und die langsamere Gewichtszunahme wurden in gleichem Maße bei entsprechenden Kontrollen beobachtet. Eine durchgeführte Organverimpfung infizierter Tiere auf verschiedene Zellkulturen erbrachte keinen Virusnachweis. In wie weit eine evt. Interferon- und SPF-Bildung, bzw. das Alter der Ratten eine Rolle spielte, konnte hier nicht geklärt werden.

Bei Saugratten, die mit Cyclophosphamid vorbehandelt waren, zeigte sich dagegen nach Infektion mit HCMV eine gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Mortalität.

Da auch in diesem Fall ein kultureller Virusnachweis erfolglos blieb, muß bei diesen Tieren ein möglicherweise latenter Infektionsverlauf in Betracht gezogen werden.

Die histologisch nachgewiesenen hepatozellulären Veränderungen bei einigen dieser Ratten können mit einem zytotoxischen Effekt des Virus in Zusammenhang gebracht werden.

Bakteriologische Untersuchungen verschiedener Organe dieser Saugratten ergaben keine Hinweise auf eine Erregerbesiedelung.

D. Literatur

1. Berenbaum, M. C.

Immunosuppressive agents
Brit. med. Bull. 21: 140 - 141 (1965)

2. Black, P., J. Hartley et W. Rowe; zit. nach Raynaud

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 112: 601 (1963)

3. Blumer, H., M. Richter, F. Cua-Lin, and A. Rose

Precipitating and nonprecipitating antibodies
in the primary and secondary immune response.
J. Immunol. 88: 669 (1962)

4. Brendel, W., W. Land

Grundlagen der Therapie mit Antilymphozyten-
Globulin.
In: Autoimmunkrankheiten, Klinik und Therapie,
Schattauer, Stuttg. 43 (1969)

5. Burck, H. C.

Histologische Technik
Thieme Verlag: 60 (1966)

6. Cole, G. A. and N. Nathanson

Potentiation of experimental arbovirus
encephalitis by immunosuppressive doses of
cyclophosphamide.
Nature (Lond.) 220: 399 - 401 (1968)

7. Dobrzyński, L.

Pathogenesis of herpetic encephalitis in
cortisone-treated mice.
Acta virol. : 377 - 382 (1970)

8. Diosi, P., L. Babusceac, and C. David

Recovery of cytomegalovirus from the
submaxillary glands of ground squirrels.
Arch. f. Virusforschg. 20: 383 (1967)

9. Dukor, P. und F. M. Dietrich

Charakteristische Merkmale der Immunsup-
pression durch Steroide und zytotoxische
Substanzen.
Int. Arch. Allerg. 34: 32 - 48 (1968)

10. Dukor, P. und F. M. Dietrich

Medikamentöse Erzeugung spezifischer Immuntoleranz: Besonderheiten der immunsuppressiven Wirkung von Cyclophosphamid und Cortison. Symposium der deutschen Gesellschaft für Allergie- und Immunitätsforschung Bonn: 255 - 268 (1968)

11. Eagle, H.

PSEBM 89: 362 (1955)

12. Finger, H.

Die Depression der primären Immunitätsreaktion durch 6-Merkaptopurin und Cyclophosphamid bei verschiedenen Tierarten. II. Die unterschiedliche Beeinflussung der Antikörperbildung von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen durch 6-Merkaptopurin und Cyclophosphamid. Z. ges. exp. Med. 143: 105 - 120 (1967)

13. Göing, H., G. Günther, S. Gujarathi und P. Kaiser

Durch Cyclophosphamid herbeigeführte immunozyten-Depression der Ratte. Int. Arch. Allerg. 38: 420 - 426 (1970)

14. Gordon, R. O., M. E. Wade and M. S. Mitchell

The production of tolerance to human erythrocytes in the rat with cytosine arabinoside or cyclophosphamide. J. Immunol. 103: 233 - 243 (1969)

15. Goetz, O.

Die Ätiologie der interstitiellen sogenannten plasmazellulären Pneumonie des jungen Säuglings. Ferd. Enke Verl. Stuttg.: 45 - 49 (1960)

16. Grist, N. R., C. A. C. Ross, E. J. Bell, E. J. Stott

Diagnostische Methoden in der klinischen Virologie. Thieme Stuttg.: 38 - 40 (1969)

17. Haseloff-Hoffmann

Kleines Lehrbuch der Statistik. Walter de Gruyter & Co, Berlin: 171- 172 (1970)

18. Hegewald, G., G. Bärenwald, A. Grisk und K.-U. Möritz
Elektronenmikroskopische Befunde bei Leberschäden durch Arzneimittel (Choleretika, Cyclophosphamid, Phenylindandion).
Zschr. inn. Med. 23: 821 - 824 (1968)
19. Henson, D., R. D. Smith, J. Gehrke, C. Neapolitan
Effect of cortisone on nonfatal mouse cytomegalovirus infection.
Americ. J. Path. 51: 1001 (1967)
20. Homan, E. R., R. P. Zendzian, W. M. Busey and L. P. Rall
Loss of hair in experimental animals induced by cyclophosphamide.
Nature (Lond.) 221: 1058 - 1059 (1969)
21. Kass, E. H.
The effect of adrenal steroids corticotropin and growth hormon in resistance to experimental infections.
J. Exp. Med. 99: 89 (1954)
22. Kazár, J., R. Brezina, V. Mayer
Study on the effect of cyclophosphamide on experimental rickettsial infection.
Acta virol. 15: 499 - 509 (1971)
23. Kilbourne, E. D., and F. L. Horsefall jr.
Increased virus in eggs infected with cortisone.
Proc. Soc. Exp. Biol. 76: 116 (1951)
24. Kim, K. S., and R. I. Carp
Abortive infection of human diploid cells by murine cytomegalovirus.
Infect. and Immun. 6: 793 (1972)
25. Kröger, H., L. Papanastasiu, J. Potel
Einfluß von Endoxan (Cyclophosphamid) und 6-Merkaptopurin auf den Nukleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus*.
Zschr. Naturforschg. 23: 73 - 77 (1968)
26. Kuttner, A. G., T. T'ung
Further studies on the submaxillary gland viruses of rats and guinea pigs.
J. Exp. Med. 62: 805 - 823 (1935)

27. Kuttner, A. G., S.-H. Wang

The problem of the significance of the inclusion bodies found in the salivary glands of infants, and the occurrence of inclusion bodies in the submaxillary glands of hamsters, white mice, and wild rats (Peiping).

J. Exp. Med. 60: 773 - 789 (1934)

28. Lübke, A.

Resistenzänderung von Mäusen gegenüber einer Virusinfektion durch Vorbehandlung mit Cyclophosphamid.

Zschr. ges. exp. Med. 154: 126 - 139 (1971)

29. Mackiewicz, U.

Effect of cyclophosphamide on serum proteins in rats.

Acta Pol. Pharm. (Transl) 24: 551 - 555 (1967)

30. Many, A., R. S. Schwartz

Durch Pharmaka herbeigeführte Immuntoleranz: Ort der Wirkung von Cyclophosphamid.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (Transl.) 133: 754 - 757 (1970)

31. Mayer, V.

Viral infection and resistance in immunosuppressed host. I. Activation patterns of silent arbovirus infections.

Acta virol. 16: 323 - 335 (1972)

32. Medearis, D.

zit. nach Raynaud

Bull. Johns Hopkins Hosp., 114: 181 (1964)

33. Meulen, V. ter, H. Koprowski, Y. Iwasaki, Y. M. Käckell

Fusion of cultured multiple-sclerosis brain cells with indicator cells: presence of nucleocapsids and virions and isolation of para-influenzatype virus.

Lancet, July 1972: 1 - 5

34. Miller, J. J., L. J. Cole

Resistance of long-lived lymphocytes and plasma cells in rat lymph nodes to treatment with prednisone, cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, and actinomycin D.

J. Exp. Med. 126: 109 - 125 (1967)

35. Miyoshi, K., E. T. Gamboa, D. H. Harter, A. Wolf, K. C. Hsu

Influenza virus encephalitis in squirrel monkeys receiving immunosuppressive therapy.
J. Immunol. 106: 1119 - 1121 (1971)

36. Pichlmayr, R.

Herstellung und Wirkung heterologer Antihundelymphozytenserum.
Zschr. ges. exp. Med. 143: 161 (1967)

37. Potel, J.

Einfluss von Zytostatika auf die Antikörperbildung.
III. Internat. Kongr. Chemother. 1963 Stuttgart, Thieme 1964: 1639 - 1642

38. Potel, J.

Immunsuppression durch kanzerotoxische Substanzen.
Organtransplantation, Sympos. dtsh. Gesell. f. Allergie- u. Immunitätsforschg.
Bonn 1958: 287 - 292

39. Potel, J. und N. Brock

2. Mitteilung: Beeinflussung der Antikörperbildung durch N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureesterdiamid.
Arzneim.-Forsch. 15: 659 - 666 (1965)

40. Raynaud, J. et C. Barreau

Transmission du virus salivaire du Mulot (Apodemus sylvaticus) à la Souris.
Compt. rend. Acad. Sc. Paris 260: 1034 (1965)

41. Raynaud, J., P. Atanasiu, C. Barreau et M. Jähkola

Adaption d' un virus cytomégalique provenant du Mulot (Apodemus sylvaticus) sur différentes cellules hétérologues, y compris les cellules humaines.
Compt. rend. Acad. Sc. Paris 269: 104 (1969)

42. Robinson, T. W. E. and R. B. Heath

Effect of cyclophosphamide on the production of interferon.
Nature (Lond.) 217: 178 - 179 (1968)

43. Robinson, T. W. E., R. J. R. Cureton and R. B. Heath

The effect of cyclophosphamide on sendai virus infections of mice.

J. med. Microbiol. 2: 137 (1969)

44. Romeis, B.

Mikroskopische Technik

Leipnitz-Verlag, 1948: 692

45. Santos, G. W. and A. H. Owens jun.

19 S and 7 S antibody production in the cyclophosphamide or methotrexate-treated rat. Nature (Lond.) 209: 622 - 624 (1966)

46. Schmidt-Ruppin, K. H.

Chemotherapy of cytomegalovirus infections: Further results on intraperitoneal infection of Ehrlich ascites tumor mice with viruses of low virulence in vitro: MCMV/Smith, Adenovirus 2, RSV/Long and Rhinoviruses. Chemoth. 16: 130 - 143 (1971)

47. Schneider, R.

Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit einiger Zytostatika und der Röntgenbestrahlung. 2. Mitteilung: Histologische und zytologische Befunde der Milz, Antikörperbestimmung nach Brucella-melitensis-Antigengabe und Knochenmarkveränderungen als Folge der Einwirkung von N-List-Phosphamidester, Trisäthyleniminobenzochinon, Röntgenbestrahlung einzeln und in verschiedenen Kombinationen bei der normalen Wistar-Ratte. Strahlenther. 124: 75 - 85 (1964)

48. Seifert, G. und I. Oehme

Cytomegalie

In: Infektionskrankheiten Band I/1

Gsell-Mohr, Springer 1967: 135 - 136

49. Sesterhenn, K., G. Dostal, G. Hermann

Quantitative Untersuchungen zur Kinetik der cellulären Immunantwort nach Immunsuppression durch Endoxan.

Sonderdr.: Verhandlungen der Dtsch. Gesell. f. inn. Med., 76. Band, Bergmann, München 1970: 99 - 102

50. Sharbaugh, R. J. and J. B. Grogan
Suppression of reticuloendothelial function
in the rat with cyclophosphamide.
J. of Bacteriol. 100: 117 - 122, (1969)
51. Smith, M.
zit. nach Raynaud
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 86: 435 (1954)
92: 425 (1956)
52. Stender, H. S., D. Strauch, H. Winter und W. Textor
Die Wirkung des Cyclophosphamids bei frakti-
onierter oder massierter Dosierung auf die
Antikörperbildung.
Arzneim.-Forsch. 13: 1031 - 1034 (1963)
53. Thind, I. W. and W. H. Price
The effect of cyclophosphamide treatment on
experimental arbovirus infections.
Amer. J. Epid. 90: 62 (1969)
54. Thind, I. W. and W. H. Price
A new spezific humoral viral resistance
factor, serum protective factor - some
biologic and physical properties.
J. Immunol. 106: 1559 - 1565 (1971)
55. Tripathy, S. P., and G. B. Mackaness
The effect of cytotoxic agents on the primary
immune response to listeria monocytogenes.
J. Exp. Med. 130: 1 - 16 (1969)
56. Ward, P. A. and A. G. Johnson
Studies on the adjuvant action of bacterium
endotoxins of antibody formation: Antibody-
formation on cortisone treated rabbits.
J. Immunol. 82: 428 (1959)
57. Wiesmann, E.
Med. Mikrobiologie
Thieme, Stuttg. 1971: 343 - 346
58. Wilmanns, W.
Immunbiologische Grundlagen der medikamentö-
sen Immunsuppression.
In: Medikamentöse Immunsuppression
Thieme, Stuttg. 1971: 3 - 17

59. Zachiesche, W. und K. Augsten

Experimentelle Studien über die Wirkung von
Antibiotika und Antitumorverbindungen auf
die phagozytische Aktivität des retikuloendo-
thelialen Systems.

Chemother. 13: 257 - 270 (1968)

Lebenslauf

Am 3. November 1947 wurde ich als Sohn des damaligen Assistenzarztes Dr. med. Curt Mietaschk und seiner Ehefrau Gisela, geb. Bartling, in Oberstdorf im Allgäu geboren. Meine Kindheit verlebte ich als ältester von 3 Geschwistern in Sonthofen, wo ich 1954 in die Volksschule eintrat.

Wegen Versetzungen meines Vaters mußte ich häufig die Schulen wechseln: 1957 Volksschule Kaufbeuren - 1958 Aufnahmeprüfung und Eintritt in das humanistische Gymnasium Kaufbeuren - 1962 humanistisches Gymnasium Günzburg/Donau - 1965 Karls gymnasium München-Pasing. Dort legte ich 1967 die Reifeprüfung ab.

Im Herbst 1967 begann ich an der Universität München das Studium der Veterinärmedizin. Nach 2 Semestern bestand ich das Vorphysikum und wechselte in die humanmedizinische Fakultät über. Dort legte ich im Herbst 1970 das Physikum ab. Im Herbst 1973 werde ich das medizinische Staatsexamen antreten.

